

Untersuchungen zur
hyaluronidasehemmenden Wirkung
des Heparins im Tierversuch

von

HILDE MAXEIN

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. W. Seitz)

Untersuchungen zur hyaluronidasehemmenden Wirkung des
Heparins im Tierversuch

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hilde Maxein
aus
Heimbach
1959



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung:

16.6.1959

Meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Problematik	4
Eigene Versuche	5
Methodik	5
Versuchsreihen	6
Statistische Auswertung	8
Diskussion	22
Zusammenfassung	23
Literaturverzeichnis	25

Problematik

M a t h i e s ¹⁻⁵ und Mitarbeiter ⁶⁻⁹ haben gezeigt, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung der Salicylate, des Prednisolons, des Chloraethylbenzmethoxazons und der Moorbäder an die Anwesenheit der Nebenniere gebunden ist, indem die hyaluronidasehemmende Wirkung dieser Stoffe bei adrenaletomierten Ratten ausblieb. Dieses Ergebnis schien die früher geäußerte Vermutung der Bedeutung der Nebennierenrinde für die Hyaluronidasehemmung zu bestätigen. Jedoch haben die weiteren Versuche gezeigt, daß diese Vermutung zu Unrecht besteht. M a t h i e s ¹⁻⁵ und Mitarbeiter ⁶⁻⁹ fanden, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung bei hypophysectomierten Ratten erhalten ist. Gleichzeitig bleibt aber nach Versuchen von D o m e n j o z ¹⁰, M a t h i e s ¹¹ und J u n g ¹² die Ascorbinsäureabnahme der Nebenniere bei hypophysectomierten Ratten aus. Da der Ascorbinsäuredepletionseffekt nach S a y e r s und S a y e r s ¹³ als Ausdruck der Nebennierenrindenaktivität zu gelten hat, muß angenommen werden, daß bei hypophysectomierten Tieren keine inkretorische Funktion der Nebennierenrinde vorliegt, obwohl die hyaluronidasehemmende Wirkung entsprechend wirksamer Substanzen erhalten ist. Es blieb demnach anzunehmen, daß die Hyaluronidasehemmung über eine Nebennierenmarkfunktion läuft. Diese Annahme konnte durch Versuche von M a t h i e s ¹⁴ und S c h e u f e l e ¹⁵ bestätigt werden, nach denen Adrenalin und Noradrenalin als Hormone des Nebennierenmarkes auch bei adrenaletomierten Tieren eine Hyaluronidasehemmung gleicher Größenordnung herbeiführen. Ferner zeigten Versuche von M a t h i e s ¹⁶ und Mitarbeitern ¹⁷⁻²⁰, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung der Salicylate, der Glucocorticoide, des Oestronsulfates und der Moorbäder nach vorheriger Ergotamintartrat-Injektion ausbleibt. Diese Versuchsergebnisse bildeten eine weitere Bestätigung für die Vermutung einer Nebennierenmarkfunktion beim Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung in vivo.

Vergleichsversuche mit Registrierungen der Pupillenweite von M a t h i e s ¹⁴ und S c h e u f e l e ¹⁵ ergaben, daß die hyaluronidasehemmende Wirkung des Adrenalins und Noradrenalins erst zu ei-

nem Zeitpunkt sichtbar wird, in dem die bekannten primären Katecholaminwirkungen längst abgeklungen sind. Der Zeitpunkt des Auftretens der Hyaluronidasehemmung ist dosisabhängig, indem die Hemmung bei geringeren Katecholamindosen eher auftritt als bei höheren. Das Ausmaß der Hyaluronidasehemmung ist nicht signifikant dosisabhängig, jedoch ist eine Mindestmenge von über 0,5 μ g Adrenalin bzw. Noradrenalin/100 g Tier notwendig, um überhaupt eine faßbare Hyaluronidasehemmung zu erzielen. Nach diesen Versuchen war die Frage, ob eine zeitliche Abhängigkeit vom Beginn der Katecholaminwirkung vorliegt, oder ob ein Wirkungsablauf anzunehmen ist, der erst nach Abklingen der Katecholaminwirkung in Gang gesetzt wird. Zur Klärung dieser Fragen wurden von Mathies²¹ und Schlierf⁷ Versuche mit Daueradrenalininfusionen über 2 Stunden bei adrenaletomierten Tieren durchgeführt, die gezeigt haben, daß in dem bestimmten Zeitabstand erst nach Absetzen der Infusion die Hyaluronidasehemmung sichtbar wird. Damit ist geklärt, daß das Auftreten der Hyaluronidasehemmung erst nach Abklingen der Katecholaminwirkung eintreten kann, also gewissermaßen erst in der "Gegenregulationsphase" auf die primäre Katecholaminwirkung. Damit war noch keine Vermutung ausgesprochen, welcher Reaktionsablauf hier wirksam wird. Es war anzunehmen, daß im Körper vorkommende Substanzen, die ebenfalls eine hyaluronidasehemmende Wirkung auch bei adrenaletomierten Tieren besitzen, hier wirksam werden. Vom Heparin ist beispielsweise eine hyaluronidasehemmende Wirkung in vivo und in vitro bekannt. Aufgabe der vorgelegten Arbeit war es, zu zeigen, ob Heparin auch bei adrenaletomierten Tieren eine Hyaluronidasehemmung hervorruft, ferner, ob diese Wirkung auch durch Protaminsulfat als heparininaktivierender Substanz blockierbar ist und ob man gegebenenfalls die hyaluronidasehemmende Wirkung z.B. eines Salicylates durch Protaminsulfat blockieren kann. Diese Untersuchungen sollten die Möglichkeit einer Mitwirkung des Heparins oder heparinähnlicher Substanzen beim Zustandekommen der in vivo-Hyaluronidasehemmung wahrscheinlich machen.

Eigene Versuche

Methodik

Für die Versuche wurden männliche weiße Ratten im Gewicht von 155 bis 215 g verwendet. Die Hyaluronidaseaktivität wurde an der Ausbreitung

einer Farbstoff- bzw. Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor und zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion der zu prüfenden Substanzen ermittelt. Hierzu wurde die Bauchhaut vor dem Versuch mit Pilca enthaart. Die reine Farbstoffquaddel wurde mit 0,1 ccm einer 0,6%igen Evansblaulösung streng intracutan gesetzt. Zur Herstellung der Farbstoff+Hyaluronidase-Lösung wurden in 2 ccm der genannten Farbstofflösung 150 IE Hyaluronidase (Kinetin) gelöst, so daß bei der intracutanen Injektion von 0,1 ccm 7,5 IE Hyaluronidase zur Wirkung kamen. Ausgewertet wurde die 10 Minuten nach Injektion erreichte Ausbreitung der Farbstoffquaddel. Diese wurden durch Übertragung der Konturen auf Zelluloidstreifen und anschließende planimetrische Ausmessung bestimmt. Naturgemäß zeigt die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel eine weit raschere Ausbreitung als die reine Farbstoffquaddel, dagegen weist die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel eine gewisse Hemmung der Ausbreitung auf, wenn eine hyaluronidasehemmende Substanz appliziert wird. Die Versuche wurden in Narkose mit 30 mg Evipan-Natrium/100 g Tier durchgeführt. Ein Einfluß von Barbituraten auf die Aktivität der Hyaluronidase besteht nach W i l h e l m i ²² nicht.

Die Adrenalektomie wurde 48 Stunden vor dem Versuch in Äthernarkose durchgeführt. Die adrenaletomierten Tiere wurden mit Hafermark und Zucker kohlehydratreich ernährt und erhielten zur Aufrechterhaltung des Ionenhaushaltes physiologische NaCl-Lösung als Trinkflüssigkeit. 48 Stunden nach der Adrenalektomie ist nach K a r g ²³, B a c h m a n n ²⁴ und C a n a l i s ²⁵ kaum eine Regeneration funktionsfähigen Nebennierengewebes anzunehmen.

Heparin (Liquemin) wurde in den betreffenden Versuchsreihen i.v. in die freigelegte Femoralvene injiziert. Auch Protaminsulfat wurde auf die gleiche Weise appliziert, dagegen Natriumsalicylat subcutan.

1. Versuchsreihe

Es wurden 1,5 E Heparin i.v./100 g Tier injiziert. Diese Heparindosis erwies sich in Vorversuchen als die geringste, noch maximal hyaluronidasehemmend wirksame Dosis. Die Hyaluronidasehemmung wurde 10, 20 und 40 Minuten nach Heparinapplikation nach der oben beschriebenen Methodik bestimmt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 1-3.

2. Versuchsreihe

Es wurde in der gleichen Weise vorgegangen wie in der 1. Versuchs-

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor 1,5 E	10'nach Heparin/100 g Tier i.v.	vor	10'nach
1 (intakte Ratten)	1	170	164 mm ²	154 mm ²	272 mm ²	212 mm ²
	2	205	168 mm ²	160 mm ²	284 mm ²	204 mm ²
	3	185	164 mm ²	144 mm ²	264 mm ²	200 mm ²
	4	195	156 mm ²	148 mm ²	268 mm ²	208 mm ²

Tabelle 1

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor 1,5 E	20'nach Heparin/100 g Tier i.v.	vor	20'nach
1 (intakte Ratten)	1	170	164 mm ²	156 mm ²	272 mm ²	225 mm ²
	2	205	168 mm ²	160 mm ²	284 mm ²	216 mm ²
	3	185	164 mm ²	156 mm ²	264 mm ²	192 mm ²
	4	195	156 mm ²	164 mm ²	268 mm ²	212 mm ²

Tabelle 2

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor 1,5 E	40'nach Heparin/100 g Tier i.v.	vor	40'nach
1 (intakte Ratten)	1	170	164 mm ²	144 mm ²	272 mm ²	212 mm ²
	2	205	168 mm ²	156 mm ²	284 mm ²	220 mm ²
	3	185	164 mm ²	152 mm ²	264 mm ²	212 mm ²
	4	195	156 mm ²	160 mm ²	268 mm ²	208 mm ²

Tabelle 3

reihe, jedoch wurden für diese Versuche adrenaletomierte Tiere verwendet. Das Ausmaß der Hyaluronidasehemmung 10, 20 und 40 Minuten nach Heparininjektion ist in den Tabellen 4-6 aufgezeichnet.

3. Versuchsreihe

In den Versuchen dieser Reihe wurde den Tieren unmittelbar vor der Injektion von ebenfalls 1,5 E Heparin/100 g Tier 1,5 mg Protaminsulfat/Tier intravenös verabreicht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Tabelle 7-9 zeigen im Zusammenhang mit der statistischen Auswertung, daß 10, 20 und 40 Minuten nach der Heparininjektion eine sichere Hyaluronidasehemmung nicht mehr nachweisbar ist.

4. Versuchsreihe

Nachdem S c h m i d t ¹⁷ die Hyaluronidasehemmung durch Natriumsalicylat in eigenen Versuchen bestätigen konnte (Tabelle 10), wurden in der Versuchsreihe 4 dieser Arbeit die gleichen Dosen Natriumsalicylat s.c. verabreicht (50 mg/100 g Tier); nachdem unmittelbar vor dem Versuch 1,5 mg Protaminsulfat/Tier i.v. verabreicht worden waren. Die Hyaluronidasehemmung wurde 10, 20 und 50 Minuten nach Natriumsalicylatinjektion gemessen. (S c h m i d t ¹⁷ fand 50 Minuten nach Natriumsalicylat-Gabe das Maximum der Hyaluronidasehemmung dieser Substanz.) Die Versuchsergebnisse, die in Tabelle 11-13 verzeichnet sind, zeigen, daß nach vorheriger Protaminsulfatgabe die Hyaluronidasehemmung des Natriumsalicylats durch Protaminsulfat blockierbar ist.

5. Versuchsreihe

Es wurde in dieser Versuchsreihe geprüft, in wie weit die angewandte Heparin-Dosis von 1,5 E/100 g einen Einfluß auf die Gerinnungszeit ausübt. Es wurden den Ratten 1,5 E Heparin/100 g Ratte i.v. injiziert und nach 30 Minuten die Rekalzifizierungszeit bestimmt. Die hierfür notwendige Blutmenge von 1 ccm wurde durch Ventrikelpunktion des Herzens gewonnen. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 14 und sind nicht sicher als Zeichen einer eindeutigen Verlängerung der Blutgerinnung verwertbar.

Berechnung und statistische Auswertung

Zur prozentualen Berechnung der Hyaluronidasehemmung wurde die Ausbreitung der reinen Farbstoffquaddel einer 100%igen Hemmung gleichgesetzt, da eine Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidaseaktivität die gleiche Ausbreitung zeigen würde.

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor 1,5 E	10'nach Heparin/100 g Tier i.v.	vor	10'nach
2 (adrenalekt. Ratten)	5	195	164 mm ²	152 mm ²	272 mm ²	252 mm ²
	6	215	136 mm ²	124 mm ²	260 mm ²	224 mm ²
	7	155	156 mm ²	144 mm ²	264 mm ²	212 mm ²
	8	175	140 mm ²	128 mm ²	220 mm ²	208 mm ²

Tabelle 4

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor 1,5 E	20'nach Heparin/100 g Tier i.v.	vor	20'nach
2 (adrenalekt. Ratten)	5	195	164 mm ²	160 mm ²	272 mm ²	232 mm ²
	6	215	136 mm ²	148 mm ²	260 mm ²	236 mm ²
	7	155	156 mm ²	148 mm ²	264 mm ²	224 mm ²
	8	175	140 mm ²	136 mm ²	220 mm ²	200 mm ²

Tabelle 5

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor 1,5 E	40'nach Heparin/100 g Tier i.v.	vor	40'nach
2 (adrenalekt. Ratten)	5	195	164 mm ²	144 mm ²	272 mm ²	260 mm ²
	6	215	136 mm ²	152 mm ²	260 mm ²	260 mm ²
	7	155	156 mm ²	160 mm ²	264 mm ²	256 mm ²
	8	175	140 mm ²	148 mm ²	220 mm ²	224 mm ²

Tabelle 6

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor	10'nach	vor	10'nach
			1,5 E Heparin/100 g Tier i.v. nach 1,5 mg Protaminsulfat/Tier i.v.			
3 (intakte Ratten)	9	205	164 mm ²	160 mm ²	232 mm ²	232 mm ²
	10	175	160 mm ²	164 mm ²	268 mm ²	244 mm ²
	11	215	168 mm ²	156 mm ²	275 mm ²	276 mm ²
	12	195	164 mm ²	168 mm ²	260 mm ²	264 mm ²

Tabelle 7

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor	20'nach	vor	20'nach
			1,5 E Heparin/100 g Tier i.v. nach 1,5 mg Protaminsulfat/Tier i.v.			
3 (intakte Ratten)	9	205	164 mm ²	156 mm ²	232 mm ²	220 mm ²
	10	175	160 mm ²	152 mm ²	268 mm ²	252 mm ²
	11	215	168 mm ²	160 mm ²	275 mm ²	260 mm ²
	12	195	164 mm ²	156 mm ²	260 mm ²	248 mm ²

Tabelle 8

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor	40'nach	vor	40'nach
			1,5 E Heparin/100 g Tier i.v. nach 1,5 mg Protaminsulfat/Tier i.v.			
3 (intakte Ratten)	9	205	164 mm ²	160 mm ²	232 mm ²	244 mm ²
	10	175	160 mm ²	156 mm ²	268 mm ²	248 mm ²
	11	215	168 mm ²	164 mm ²	275 mm ²	264 mm ²
	12	195	164 mm ²	168 mm ²	260 mm ²	256 mm ²

Tabelle 9

Versuchsreihe	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel		N	Hemmung
	vor	50'nach	vor	50'nach		
50mg Natr.Sali- cylat/100g s.c. (nach Schmidt)	156 mm ²	147 mm ²	283 mm ²	236 mm ²	4	35,4%

Tabelle 10

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff-Hyase-Quaddel	
			vor	10'nach	vor	10'nach
			50mg Natriumsalicylat/100g Tier i.v. nach 1,5 mg Protaminsulfat/Tier s.c.			
4 (intakte Ratten)	13	205	148 mm ²	132 mm ²	252 mm ²	272 mm ²
	14	205	148 mm ²	154 mm ²	260 mm ²	244 mm ²
	15	215	160 mm ²	148 mm ²	268 mm ²	252 mm ²
	16	190	156 mm ²	152 mm ²	256 mm ²	260 mm ²

Tabelle 11

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor	20'nach	vor	20'nach
			50mg Natriumsalicylat/100g Tier i.v. nach 1,5 mg Protaminsulfat/Tier s.c.			
4 (intakte Ratten)	13	205	148 mm ²	132 mm ²	252 mm ²	268 mm ²
	14	205	148 mm ²	140 mm ²	260 mm ²	240 mm ²
	15	215	160 mm ²	152 mm ²	268 mm ²	260 mm ²
	16	190	156 mm ²	148 mm ²	256 mm ²	264 mm ²

Tabelle 12

Versuchsreihe	Tier-Nr.	Tier-gewicht in g	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyase-Quaddel	
			vor	50'nach	vor	50'nach
			50mg Natriumsalicylat/100g Tier i.v. nach 1,5 mg Protaminsulfat/Tier s.c.			
4 (intakte Ratten)	13	205	148 mm ²	132 mm ²	252 mm ²	228 mm ²
	14	205	148 mm ²	144 mm ²	260 mm ²	252 mm ²
	15	215	160 mm ²	152 mm ²	268 mm ²	268 mm ²
	16	190	156 mm ²	160 mm ²	256 mm ²	252 mm ²

Tabelle 13

Tier Nr.	Rekalzifizierungszeit		%
	vor	30' nach	
	1,5 E Heparin/100g Tier i.v.		
17	83	76	91,5
18	55	65	118,2
19	63	81	128,6
20	72,5	80,5	111,0
21	54	59	109,3
22	57	60	162,2
23	45	57	126,7
$\bar{x}$			121,1

Tabelle 14

Einer 0%igen Hemmung entspricht die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel vor dem Versuch, also ehe eine hyaluronidasehemmende Wirkung eines Stoffes wirksam wurde. Unter Berücksichtigung dieser beiden Festpunkte wurde an der Flächenausbreitung der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel nach dem Versuch die prozentuale Hemmung errechnet.

Die statistische Auswertung hatte zu prüfen, ob es berechtigt ist anzunehmen, daß die Medikation auf die Ausbreitung der Farbstoff-Quaddel keinen Einfluß hat und, ob und in welcher Weise die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel durch die Medikation beeinflußt wird.

Da für jeden Zeitpunkt einer Versuchsreihe Messungen der Ausbreitung beider Quaddel-Arten vorlagen, war es möglich, die beiden obigen Fragestellungen getrennt zu behandeln. Eine Begründung hierfür wird weiter unten erfolgen. In beiden Fällen jedoch erfolgte die statistische Auswertung nach dem gleichen statistischen Modell, einem sogenannten linearen Modell. Hierbei wurde angenommen, daß sich jeder Quaddel-Typus, von einem Zeitpunkt des Versuches zum anderen, um einen festen, von den Versuchstieren unabhängigen Betrag ändert. Äquivalent hiermit ist die Annahme, daß entsprechende Quaddeln verschiedener Tiere sich untereinander um einen festen, nur von den Versuchstieren, jedoch nicht vom Zeitpunkt des Versuches abhängigen Betrag unterscheiden.

Entsprechend dem linearen Modell, erfolgte die eigentliche statistische Auswertung jeder Versuchsreihe durch je eine Varianz-Analyse für jeden der beiden Quaddel-Typen. Zur Schätzung der biologischen Variabilität in der Reaktion der Tiere, zogen wir die Abweichungen der empirisch ermittelten Werte von den Erwartungswerten des jeweiligen linearen Modells heran. Diese Variabilität ergibt sich in den Varianz-Analysen in Gestalt der Rest-Varianz (Wechseleinwirkung Tiere - Zeiten). Das Ergebnis der Varianz-Analysen, d.h. die ermittelten Varianz-Komponenten, sind in den Tabellen 15 bis 18 in der üblichen Weise zusammengestellt. Es bedeutet hierin n die Zahl der Freiheitsgrade der jeweiligen Varianz-Komponente, SAQ ihr Summen-Abstandsquadrat, MAQ ihr Mittleres-Abstandsquadrat.

$F_{emp.}$ ist der Varianz-Quotient zwischen der jeweiligen Varianz-Komponente und der Rest-Varianz. Die $F_{emp.}$, in der F-Verteilung mit den unter n angegebenen Freiheitsgraden, mindestens zukommende Überschreitungswahrscheinlichkeit ist unter p angegeben, wenn sie höchstens 5% beträgt.

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Zeiten	3	343	114	3,67	-
Zwischen den Tieren	3	123	41	1,32	-
Rest-Varianz	9	284	31		
Gesamt-Varianz	15	750	50		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Zeiten	3	11.607	3.869	77,38	0,1%
Zwischen den Tieren	3	509	169	3,38	-
Rest-Varianz	9	454	50		
Gesamt-Varianz	15	12.570	838		

Tabelle 15
(Versuchsreihe 1)

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Zeiten	3	475	157	2,30	-
Zwischen den Tieren	3	867	289	4,25	5%
Rest-Varianz	9	609	68		
Gesamt-Varianz	15	1.951	130		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Zeiten	3	3.283	1.094	12,87	1%
Zwischen den Tieren	3	5.723	1.241	14,60	0,1%
Rest-Varianz	9	769	85		
Gesamt-Varianz	15	7.775	518		

Tabelle 16
(Versuchsreihe 2)

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Zeiten	3	144	48	3,00	-
Zwischen den Tieren	3	80	26	1,62	-
Rest-Varianz	9	144	16		
Gesamt-Varianz	15	368	25		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Zeiten	3	391	130	2,09	-
Zwischen den Tieren	3	2.818	939	15,14	0,1%
Rest-Varianz	9	560	62		
Gesamt-Varianz	15	3.769	251		

Tabelle 17
(Versuchsreihe 3)

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Zeiten	3	207	69	2,55	-
Zwischen den Tieren	3	822	274	10,14	1%
Rest-Varianz	9	248	27		
Gesamt-Varianz	15	1.277	85		

Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Stufen	3	200	66	-	-
Zwischen den Tieren	3	360	120	-	-
Rest-Varianz	9	1.488	165		
Gesamt-Varianz	15	2.048	137		

Tabelle 18
(Versuchsreihe 4)

Die "Varianz zwischen den Zeiten" kennzeichnet die Größe der Änderungen, die der jeweilige Quaddel-Typus von einem Zeitpunkt zum anderen erfährt. Nur wenn der zugehörige Varianz-Quotient eine Überschreitungswahrscheinlichkeit besitzt, die höchstens 5% beträgt, darf angenommen werden, daß die Abweichung zwischen den einzelnen Zeiten nicht durch die biologische Variabilität in der Reaktion der Tiere bedingt ist, d.h. nur in diesen Fällen darf angenommen werden, daß durch die Medikation ein Einfluß auf die Ausbreitung der Quaddeln bewirkt wird. Im einzelnen sind somit die Ergebnisse der Varianz-Analysen wie folgt zu interpretieren:

a) Farbstoff-Quaddel

Bei keiner der 4 Versuchsreihen ist ein Einfluß der Medikation statistisch nachweisbar. Auf Grund dieses Ergebnisses ist es zulässig anzunehmen, daß die Abweichungen zwischen den Farbstoff-Quaddeln zu verschiedenen Zeitpunkten durch die biologische Variabilität zwischen den Tieren hervorgerufen wird, und nicht einen Einfluß der Medikation darstellt.

b) Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel

Bei den Versuchsreihen 3 und 4 liefert die Varianz-Analyse für die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel ein entsprechendes Ergebnis, wie für die reine Farbstoff-Quaddel. Ein, die biologische Variabilität zwischen den Tieren übersteigender, Einfluß der Medikation auf die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel ist somit bei diesen beiden Versuchsreihen nicht nachweisbar.

Bei den Versuchsreihen 1 und 2 dagegen, besitzt der zur Varianz zwischen den Zeiten gehörige Varianz-Quotient eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von höchstens 0,1% bzw. 1%. Bei diesen Versuchsreihen liegt somit ein statistisch gesicherter Unterschied zwischen der Größe der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel von einem Zeitpunkt zum anderen vor, es darf daher angenommen werden, daß die Medikation einen Einfluß auf die Größe der Ausbreitung besitzt. Entsprechend der allgemeinen Fragestellung, die der Arbeit zugrunde liegt, war für diese beiden Versuchsreihen daher noch zu prüfen, zu welchen Zeitpunkten p.i. die Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddel statistisch gesichert kleiner als diejenige vor der Injektion ist. Das Ergebnis dieser, mit dem Test von D u n c a n ²⁶ durchgeführten Prüfung, findet sich in den Tabellen 19 und 20.

	$\bar{x}$	s^2	Hyase- Hemmung	Siche- rung
Farbstoffquaddel vor	163	25		
Farbstoff+Hyase- Quaddel vor	272	74		
Farbstoffquaddel nach 10'	151	49		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 10'	206	26	57,1%	1%
Farbstoffquaddel nach 20'	159	14		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 20'	211	194	52,6%	1%
Farbstoffquaddel nach 40'	153	46		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 40'	213	25	51,1%	1%

Tabelle 19
(Versuchsreihe 1)

	$\bar{x}$	s^2	Hyase- Hemmung	Siche- rung
Farbstoffquaddel vor	149	174		
Farbstoff+Hyase- Quaddel vor	254	538		
Farbstoffquaddel nach 10'	137	174		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 10'	224	394	27,8%	1%
Farbstoffquaddel nach 20'	148	96		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 20'	223	260	28,8%	1%
Farbstoffquaddel nach 40'	151	47		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 40'	250	304	3,7%	-

Tabelle 20
(Versuchsreihe 2)

Geht man von der Annahme aus, daß die an verschiedenen Versuchstieren, zu einem Zeitpunkt t , bestimmte Fläche der Quaddeln normalverteilt sind mit dem Erwartungswert m_t und der Varianz σ_t^2 , so sind Mittelwert $\bar{x}_t$ und Varianz s_t^2 der empirischen Meßwerte, Schätzwerte dieser Parameter. Die Differenz zwischen den zu verschiedenen Zeitpunkten gehörigen empirischen Mittelwerten kann als Schätzwert der entsprechenden Änderungen der Erwartungswerte der Normalverteilungen angesehen werden. Die Varianzen σ_t^2 , bzw. ihre Schätzwerte s_t^2 sind ein Maß für die Abweichung der Meßwerte der einzelnen Versuchstiere von dem jeweiligen Erwartungswert. Sie sagen jedoch nicht direkt etwas über die biologische Variabilität in der Reaktion der Tiere aus. Sind allerdings die empirischen Varianzen s_t^2 untereinander homogen, so deutet dieses darauf hin, daß die Reaktion der Tiere eine gleichmäßige ist und, daß das lineare Modell der statistischen Auswertung den empirischen Sachverhalt angemessen wiedergibt. Wir prüften daher mittels des Bartlett-Testes, ob es berechtigt ist anzunehmen, daß die empirischen Varianzen homogen sind. Bei jeweils $n = 3$ Freiheitsgraden ergaben sich hierbei die nachstehenden χ^2 -Werte, denen mindestens die unter p angegebene Überschreitungswahrscheinlichkeit zukommt.

	Farbstoff-Quaddel		Farbstoff+Hyalase-Quaddel	
	χ^2	p	χ^2	p
Versuchsreihe 1	1,581	70%	4,438	30%
Versuchsreihe 2	1,397	80%	1,952	70%
Versuchsreihe 3	1,390	80%	2,162	70%
Versuchsreihe 4	1,548	70%	0,465	95%

Bei allen Versuchsreihen darf somit angenommen werden, daß zwischen den empirischen Varianzen die erforderliche Homogenität vorliegt.

In den Tabellen 19 bis 22 sind für jede Versuchsreihe die Werte der empirischen Mittelwerte $\bar{x}_t$ und der empirischen Varianzen s_t^2 für jeden Zeitpunkt angegeben. Außerdem findet sich in diesen Tabellen die wie üblich berechnete prozentuale Hyaluronidase-Hemmung und außerdem, sofern eine statistisch gesicherte Hyaluronidaschemmung vorliegt, die Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der diese statistische Sicherung behaftet ist.

Abschließend möchten wir noch auf Folgendes hinweisen. Wie die Varianz-Analysen zeigen, ist die Rest-Varianz bei den Farbstoff+Hyaluronidase-

	$\bar{x}$	s^2	Hyase- hemmung	Siche- rung
Farbstoffquaddel vor	164	11		
Farbstoff+Hyase- Quaddel vor	258	355		
Farbstoffquaddel nach 10'	162	26		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 10'	254	389	4,8%	-
Farbstoffquaddel nach 20'	156	11		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 20'	245	302	14,1%	-
Farbstoffquaddel nach 30'	162	26		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 40'	253	78	5,9%	-

Tabelle 21
(Versuchsreihe 3)

	$\bar{x}$	s^2	Hyase- Hemmung	Siche- rung
Farbstoffquaddel vor	153	36		
Farbstoff+Hyase- Quaddel vor	259	46		
Farbstoffquaddel nach 10'	146	99		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 10'	257	142	1,8%	-
Farbstoffquaddel nach 20'	143	78		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 20'	258	154	0,9%	-
Farbstoffquaddel nach 50'	147	142		
Farbstoff+Hyase- Quaddel nach 50'	250	272	8,0%	-

Tabelle 22
(Versuchsreihe 4)

Quaddeln durchweg größer als bei den reinen Farbstoff-Quaddeln, d.h. die biologische Variabilität in der Reaktion der Tiere ist bei jenen stets größer als bei diesen. Eine gemeinsame Auswertung der Farbstoff- und der Farbstoff+Hyaluronidase-Quaddeln würde diesen Umstand nicht berücksichtigen können. Dieses brächte einen Verlust in der Schärfe des Testes, der zur Prüfung der Frage, ob die Farbstoff-Quaddeln als wesentlich gleich angesehen werden können, benutzt wird. Die bei getrennter Auswertung gewonnene Aussage kann daher als wesentlich schärfer angesehen werden.

Diskussion

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit bestätigen die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparin in vivo und zwar in Dosen, die keine verwertbare Wirkung auf die Blutgerinnung mehr besitzen. Die in der Versuchsreihe 5 durchgeführten Bestimmungen der Rekalzifizierungszeit zeigen, daß ein wesentlicher Einfluß auf die Blutgerinnungsfaktoren nicht besteht. Nach H a r d e g g und M a a s s ²⁷ liegt die Grenzdosis, die bei Ratten gerade noch die Blutgerinnung beeinflußt, bei 12,5 bis 15,0 IE/100g, diese Dosis liegt also um ein zehnfaches höher als die Menge, die nach unseren Versuchen noch eine deutliche Hyaluronidasehemmung ergibt. Auch wir haben zwar einen geringen Einfluß bei dieser zehnfach geringeren Dosis auf die Rekalzifizierungszeit noch feststellen können, die aber in ihrem Ausmaß nicht sicher verwertbar ist. Demnach sind alle Methoden, die auf der Feststellung von Blutgerinnungsveränderungen durch Heparin beruhen, nicht geeignet, beim Nachweis einer hyaluronidasehemmenden Wirkung bzw. auch einer in der Rheumatherapie feststellbaren Wirkung des Heparins angewandt zu werden. Es ist bekannt, daß die Hyaluronidasehemmung als ein therapeutischer Effekt der Antirheumatica eine nicht zu unterschätzende Bedeutung besitzt ^{28,29}. Dementsprechend liegen auch einige Berichte über die Rheumabehandlung mit Heparin ³⁰⁻³⁴ vor. Einen Hinweis auf die Bedeutung der Hyaluronidaseaktivität beim Rheumatismus mögen auch die Untersuchungen von A b r a h a m s , G l y n n und L o e w i ³⁵ geben, nach denen die Heparinresistenz bei Rheumatismuskranken auf einer Inaktivierung des Heparins beruht.

In der zweiten Versuchsreihe konnten wir nachweisen, daß das Heparin in der gleichen Dosierung auch bei adrenalectomierten Tieren eine

Hyaluronidasehemmung hervorruft, die in ihrem prozentualen Ausmaß zwar geringer erscheint, aber doch statistisch nachweisbar ist. Diese Tatsache würde die Überlegungen bestätigen, nach denen im Anschluß auf die Katecholaminwirkung des Nebennierenmarkes ein Reaktionsablauf in Gang gesetzt wird, in dem das Heparin vermutlich eine Rolle zu spielen scheint.

Da Protaminsulfat Heparin chemisch inaktiviert, war anzunehmen, daß es auch in der Lage ist, die hyaluronidasehemmende Wirkung zu blockieren, was wir in Versuchsreihe 3 bestätigen konnten.

Interessant waren nun besonders die Untersuchungen der Versuchsreihe 4, in denen gezeigt werden konnte, daß die bekannte und von Schmidt¹⁷ reproduzierte hyaluronidasehemmende Wirkung des Natriumsalicylates durch Protaminsulfat ebenfalls aufzuheben ist. Damit gewinnt die Annahme einer Mitwirkung des Heparins bzw. zumindest heparinähnlicher Substanzen im Körper beim Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung durch entsprechend wirksame Substanzen weiter an Wahrscheinlichkeit.

Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit konnte die hyaluronidasehemmende Wirkung, die vom Heparin auch in vivo bekannt ist, reproduziert werden. Gleichzeitig wurde gezeigt, daß dieser hyaluronidasehemmende Effekt auch bei adrenalectomierten Tieren nachweisbar ist, dagegen durch Protaminsulfat aufgehoben werden kann. Da im Zusammenhang mit diskutierten Untersuchungen anderer Autoren angenommen werden konnte, daß Heparin oder zumindest chemisch ähnliche Substanzen im Körper beim Zustandekommen der hyaluronidasehemmenden Wirkung durch z.B. Natriumsalicylat und andere entsprechend wirksame Substanzen eine Rolle spielt, wurde untersucht, ob Protaminsulfat auch die hyaluronidasehemmende Wirkung des Natriumsalicylates blockieren kann. Da dieses der Fall ist, wurde wahrscheinlich gemacht, daß die Hyaluronidasehemmung entsprechend wirksamer Substanzen im Anschluß an eine Katecholaminausschüttung über eine Freisetzung von Heparin oder heparinähnlicher Substanzen läuft.

Literaturverzeichnis

- 1) Mathies, H. u. Jankowski, A.: Klin. Wschr. 35 (1957), 892
- 2) Mathies, H.: Arzneim. Forsch. 8 (1958), 233
- 3) Mathies, H.: Zschr. f. ges. exper. Med. 131 (1959), 118
- 4) Mathies, H. u. Werther, G.v.: Arzneim. Forsch. eingereicht
- 5) Mathies, H.: im Manuskript
- 6) Jankowski, A.: Diss. München 1957
- 7) Schlierf, G.: Diss. München im Manuskript
- 8) Werther, G.v.: Diss. München 1958
- 9) Hartmann, M.: Diss. München im Manuskript
- 10) Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 225 (1955), 14
- 11) Mathies, H.: im Manuskript
- 12) Jung, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 13) Sayers, G. u. Sayers, M.: Endocrinology (Springfield) 40 (1947), 256
- 14) Mathies, H.: im Manuskript
- 15) Scheufele, R.: Diss. München 1958
- 16) Mathies, H.: im Manuskript
- 17) Schmidt, D.: Diss. München in Vorbereitung
- 18) Poulantzas, J.: Diss. München 1958
- 19) Glück, A.: Diss. München in Vorbereitung
- 20) Lingnau, W.: Diss. München in Vorbereitung
- 21) Mathies, H.: in Vorbereitung
- 22) Wilhelmi, G.: zit. Domenjoz (10)
- 23) Karg, H.: persönliche Mitteilung
- 24) Bachmann, R.: Handbuch d. mikroskop. Anatomie des Menschen VI/5 (1954),
222 ff., Springer, Berlin/Göttingen/Heidelberg
- 25) Canalis, P.: Internat. Mschr. Anat. 4, 1887a, 312; zit. Bachmann (24)
- 26) Duncan, D.B.: Multiple Range and Multiple Tests Biometrics Vol. 11,
(1955), 1
- 27) Hardegg, W. u. Maass, W.: Klin. Wschr. 33 (1955), 811
- 28) Mathies, H.: Fortschr. Med. 74 (1956), 35 (dort weitere Literatur)
- 29) Mathies, H.: Med. Klin. 52 (1957), 1676 (dort weitere Literatur)
- 30) Isemain, Dejou u. Bouala: Presse Méd. 1952, 1635
- 31) Linquette, Goudemand, Pruvost u. Lorrain: Presse Méd 1951, 1584
- 32) Greif u. Wennig: Wien. med. Wschr. 1953, 353
- 33) Mendes de Leon: Nederl. Tijdschr. Geneesk. 96 (1952), 2417
- 34) Scalabrino: Heparin-Symposion d. Società Lombarda di Science Mediche
e Biologiche, 19.12.1955, Mailand
- 35) Abrahams, D.G., Glynn, L.E. u. Loewi, G.: Clin. Science 10 (1951), 1

Herrn Prof. Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas und Herrn Dr. H. Mathies für die Beratung während der Durchführung der Versuche und der Abfassung der Arbeit. Die statistische Auswertung wurde freundlicherweise von Herrn Dipl.-Math. K. Liebrich vorgenommen. Der Deutschen Hoffmann-La Roche-Gesellschaft bin ich für die Überlassung der Versuchsmengen ihres Liquemin und Protamin-Sulfat dankbar.

Ich, Hilde Maxein, bin geboren am 20.2.1932 in Heimbach, Kreis Neuwied/Rhein, als Tochter des Fabrikanten und Gastwirtes Jakob Maxein und dessen Frau Elisabeth, geborene Birkenbeil. Nach vierjähriger Volksschule besuchte ich das städtische Oberlyzeum in Neuwied und legte dort 1953 die Reifeprüfung ab. Im gleichen Jahr begann ich im Wintersemester 1953/54 das Medizinstudium in Bonn, wechselte im Sommersemester 1955 an die Universität München und bestand dort nach dem Wintersemester 1955/56 die ärztliche Vorprüfung. Außer 2 Semestern in Würzburg verbrachte ich die klinischen Semester in München und unterziehe mich dort nach diesem Semester der ärztlichen Prüfung.

